

武蔵野大学学術機関リポジトリ Musashino University Academic Institutional Repository

インターロイキン31を標的とした アトピー性皮膚炎の制御に関する研究

著者	齊藤 恵子
学位名	博士（薬科学）
学位授与機関	武蔵野大学
学位授与年度	2014年度
学位授与番号	32680甲第21号
URL	http://id.nii.ac.jp/1419/00000218/

博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び論文審査結果の要旨

第 11 号

2015年3月

武蔵野大学大学院

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条による公表を目的として、
2015 年 3 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の
結果の要旨を収録したものである。

目 次

氏 名	学位記番号	学位の種類	論 文 題 目	(頁)
齊藤 恵子	博士甲第21号	博士（薬科学）	インターロイキン31を標的とした アトピー性皮膚炎の制御に関する 研究	・・・ 1

氏 名	齊 藤 恵 子		
学 位 の 種 類	博士（薬科学）		
学 位 記 番 号	甲第 21 号		
学位授与の日付	2015 年 3 月 19 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学 位 論 文 題 目	インターロイキン 31 を標的としたアトピー性皮膚炎の制御に関する研究		
論 文 審 査 委 員	主 査	武蔵野大学	教授
		棚 元 憲 一	
	副 査	武蔵野大学	教授
		土 方 貴 雄	
	副 査	武蔵野大学	教授
		山 下 直 美	

論文内容の要旨

アトピー性皮膚炎は、掻痒のある湿疹を主病変とする慢性疾患であり、角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリア機能障害を伴い、抗原物質に対する免疫反応やその他の機械的刺激が引き金となって発症する。掻痒に伴う掻破は、皮疹を悪化させる増悪因子であることが知られており、掻破－皮膚炎悪化－掻痒悪化の悪循環はitch-scratch-cycleと呼ばれ、病態の慢性化につながる事が知られている。従って、アトピー性皮膚炎においては、皮膚のバリア機能の維持及び炎症への対処と同様に、掻痒のコントロールがQOL向上及び皮膚炎改善のために非常に重要であるといえる。しかしながら、アトピー性皮膚炎に付随する掻痒行動を誘発する因子の解析は十分には進んでいないのが現状で、アトピー性皮膚炎の掻痒に対して多用されている抗ヒスタミン剤においてもその効果は必ずしも十分でなく、補助療法に位置づけられている。

最近、インターロイキン31（IL-31）が掻痒を誘発するサイトカインとして注目されている。IL-31は、主に活性化したT細胞から産生されるサイトカインであり、アトピー性皮膚炎患者の皮膚生検サンプルでIL-31 mRNA発現が亢進していることが報告されている。また、アトピー性

皮膚炎患者を紫外線照射で治療することにより有意な臨床スコアの改善とともに皮膚のIL-31 mRNA発現の減少が認められること、IL-31遺伝子のハプロタイプが内因性アトピー性皮膚炎と関連していることが報告されており、アトピー性皮膚炎の病態におけるIL-31の関与が示唆されている。またマウスにおいても、IL-31を過剰発現させたトランスジェニックマウスがアトピー性皮膚炎様の皮膚炎や著しい搔破行動を示すこと、アトピー性皮膚炎様の症状を自然発症するNC/NgaマウスにおいてIL-31レベルと搔破行動が相関することなどから、IL-31のアトピー性皮膚炎や搔痒発生への関与が動物実験レベルでも示されている。しかしながら、IL-31による搔痒誘発のメカニズムについては不明であり、さらに、IL-31のブロックによりitch-scratch-cycleの悪循環を遮断することがアトピー性皮膚炎の病態に治療効果を有するかについても明らかになっていない。そこで本研究では、IL-31をマウスに投与した時に誘発される搔痒の解析を行い、動物モデルや臨床で搔痒抑制効果を有することが示されている既存薬によりIL-31誘発の搔痒が影響を受けるか否かを検討した。また、IL-31レセプター中和抗体の慢性アトピー性皮膚炎モデルにおける治療効果についても評価した。

IL-31投与により誘発される搔痒の解析

初めに、IL-31による搔痒誘導の検出を目的に、IL-31をinfusion pumpにより持続投与した。IL-31はOsmotic pumpを用いて、0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/day}$ でBALB/cマウスに14日間皮下投与し、経時的に搔痒行動の測定と皮膚症状の観察を行った。搔痒行動の測定には、動物の後肢に挿入したマグネットのアナログ信号を取り込み、搔痒行動を抽出解析するMicroAct搔痒測定システム(Neuroscience)を用いた。その結果、IL-31が投与濃度依存的に搔痒行動を誘発することが検出できた。また、皮膚の状態としては、投与数日後から全身の脱毛がみられ、投与後14日目の皮膚の病理組織学的解析では、表皮の肥厚と皮脂腺細胞の増加を認めた。また、IL-31で誘発される搔痒は、投与終了後も数日間持続した。

上記試験においてIL-31投与後1日目でMicroAct搔痒測定システムによる搔痒行動の検出が可能であったことから、IL-31をsingle shotした際の搔痒行動について調べることにした。IL-31を0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/shot}$ で静脈内もしくは皮下に投与した結果、投与量依存的な搔痒行動の増加が認められ、どちらの投与ルートにおいても投与後4-6時間をピークとする持続的な搔痒反応がみられた。このIL-31投与により誘発される搔痒は、IL-31レセプター中和抗体であるBM095により完全に抑制されることを確認した(Fig. 1左図)。

IL-31 持続投与終了後も搔痒が数日間持続したこと、IL-31 の single shot においても持続的な搔痒行動が誘発されたことから、IL-31 がかゆみの感覚刺激に対し間接的に作用している可能性が示唆された。そこで IL-31 投与による搔痒誘発のメカニズムを調べる目的で、動物モデルや臨床において搔痒抑制効果が示されている既存薬が IL-31 誘発の搔痒行動に影響を及ぼすか否かを検討した。抗ヒスタミン剤である terfenadine(TER)を 30 mg/kg で IL-31 投与の 2 時間前に腹腔内投与したところ、terfenadine は IL-31 誘発の搔痒行動に影響を及ぼさなかった(Fig.1 左図)。従って、ヒスタミンは IL-31 により誘発される搔痒行動には関与しないと考えられた。同様に、免疫抑制剤である dexamethasone (DEX, 3 mg/kg, i.p.)や tacrolimus (TAC, 0.1 mg/kg, i.p.)、 μ -opioid receptor antagonist である naloxone (NAL, 10 mg/kg, s.c.)についても検討を行ったが、これらの薬剤によっても IL-31 誘発の搔痒は抑制されなかった(Fig.1 右図)。以上の結果から、IL-31 は既存薬とは異なる新規のメカニズムにより、搔痒を誘発することが示唆された。

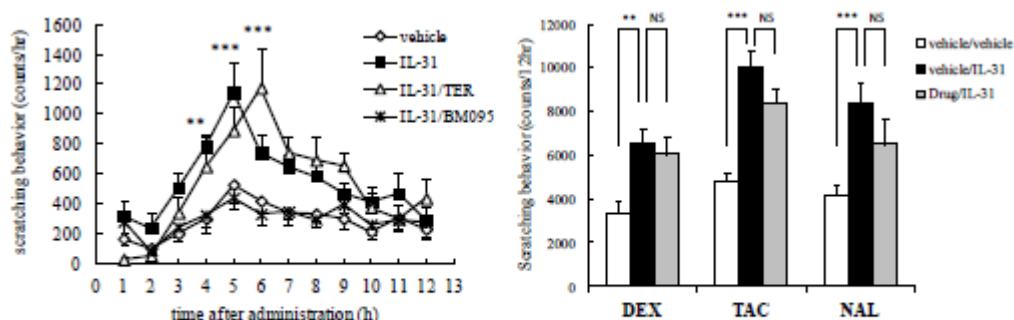


Fig.1 Effects of anti-IL31RA antibody, terfenadine, dexamethasone, tacrolimus and naloxone on the scratching behavior induced by IL-31

アトピー性皮膚炎の病態に対するIL-31レセプター中和抗体の効果

次に、IL-31の阻害がアトピー性皮膚炎の病態に対し治療効果を有するかを検討する目的で、病態の発症率がよく、オンセットをコントロール可能なモデルとして知られているハプテン繰り返し塗布により誘導する慢性アトピー性皮膚炎モデルを用いてIL-31レセプター中和抗体BM095の効果を検討した。

6週令の雌性BALB/cマウスに、20 μ Lの0.5%塩化ピクリル (acetone/olive oil (1:4 v/v)溶液)を右耳に塗布して感作を行った後、8日目より1日おきに20 μ Lの0.25%塩化ピクリル (acetone/olive oil (1:4 v/v)溶液)を右耳に塗布することにより誘発を繰り返した。BM095の予防効果評価群には感作前日より、BM095治療効果評価群には誘発開始後20日目より、10 mg/kgのBM095を週1回腹腔内に投与した。経時的に耳介腫脹と皮膚炎スコア(出血、痂皮形成、浮腫)を測定することにより、病態の評価を行った。

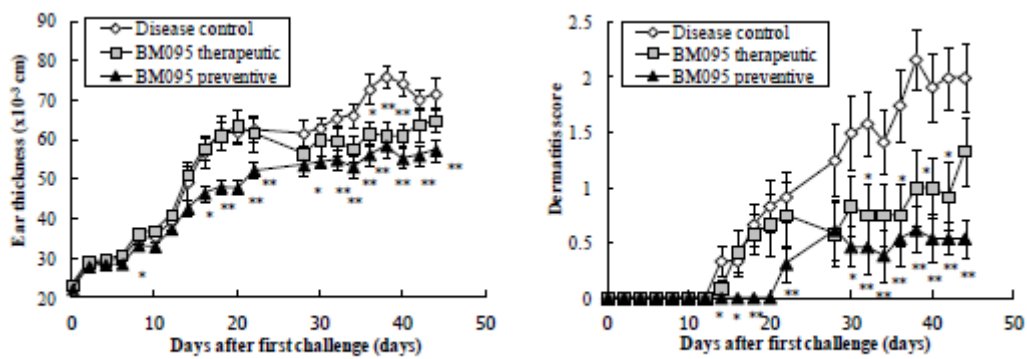


Fig.2 Effects of anti-IL31RA antibody on dermatitis in chronic atopic dermatitis model

塩化ピクリルの塗布を繰り返すことにより、耳介の腫脹が増大し (Fig.2左図)、出血や癬痕、痂皮形成を伴う皮膚炎が悪化した (Fig.2右図)。病態悪化によりみられる耳の腫脹や皮膚炎スコアの増大はBM095の予防投与により有意に軽減した (Fig.2左図・右図)。さらに、BM095は予防効果を示すだけでなく、病態成立後に投与した治療評価群においても耳介の腫脹と皮膚炎スコアを有意に抑制した (Fig.2左図・右図)。

慢性アトピー性皮膚炎モデルにおけるBM095の効果が、塩化ピクリルによる病態のオンセットに寄与しているかを調べる目的で、塩化ピクリル誘発の急性接触性皮膚炎モデルにおいてBM095の効果を検討した。雌性BALB/cマウスに、50 μ Lの7%塩化ピクリル (ethanol/acetone (3:1 v/v)溶液) を腹部皮膚に塗布して感作を行った後、5日目に20 μ Lの1%塩化ピクリル (acetone/olive oil (1:4 v/v)溶液) を耳に塗布することにより誘発を行った。感作・誘発のそれぞれ1日前に10 mg/kgのBM095を静脈内に投与した。その結果、塩化ピクリルによる誘発後24時間及び48時間でみられる耳の腫脹にBM095は効果を示さなかった。このことから、慢性のアトピー性皮膚炎モデルで見られたBM095の皮膚炎治療効果は、抗原特異的なT細胞免疫応答の抑制によるものではなく、itch-scratch cycleの遮断によるものと考えられた。実際に、慢性アトピー性皮膚炎モデルにおいてBM095は皮膚炎の治療効果を有するが、皮膚病変部位への炎症性細胞の浸潤には影響しておらず、血中のIgE, IgG1, IgG2aのレベルにおいてもBM095投与群と非投与群とで差はなかった。

考察

搔痒を誘導または増悪することが知られている因子の中には、搔痒受容器に結合することにより直接的に働く因子と、感覚神経を活性化する他の因子を誘導するなどして間接的に働く因子が知られている。IL-31のレセプターはIL-31 receptor A (IL-31RA)とオンコスタチンMレセプタ

一のヘテロダイマーであり、感覚神経が集まる後根神経節、並びにかゆみの感覚をつかさどることが知られている脊髄や皮膚の1次感覚神経に高い発現が認められる。そのため、IL-31が掻痒に関連する神経に直接的に作用している可能性が考えられる。一方で、IL-31RAは皮膚表皮細胞や好酸球、肥満細胞、単球やマクロファージにも発現していることが知られており、免疫反応や細胞増殖など幅広い生体機能を担っていることが報告されていることから、IL-31が間接的に掻痒を誘発している可能性もあり、IL-31がアトピー性皮膚炎のitch-scratch-cycleにどのように関与し、機能しているかは興味深い。本研究において、IL-31誘発の掻痒を解析することにより、IL-31は持続的な掻痒を誘発し、かゆみの感覚刺激に対し間接的に作用している可能性が示唆された。その詳細なメカニズムは未だ不明ではあるが、本研究により既存薬とは異なる新規のメカニズムを介している可能性が考えられ、今後さらなる解析が期待される。

IL-31がアトピー性皮膚炎や掻痒発生に関与していることが示唆されるが、IL-31をブロックすることによりアトピー性皮膚炎の病態に対し治療効果を有するかは明らかではなかった。2009年のExp. Dermatol.誌では、NC/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎の自然発症モデルにおいて抗IL-31中和抗体は掻痒を抑制するものの皮膚炎に対しては効果を示さないことが報告されている。本研究では、ハプテン繰り返し塗布による慢性アトピー性皮膚炎モデルを用い、IL-31レセプター中和抗体が皮膚炎の病態を軽減すること、さらには病態成立後に抗体の投与を開始しても治療効果を示すことを明らかにした。

以上、本研究の結果より、IL-31はアトピー性皮膚炎の掻痒及び皮膚炎の治療における新規の治療ターゲットとなる可能性があり、IL-31レセプターのブロックが現在の治療では十分に掻痒のコントロールができない患者の治療オプションになる可能性を示した。

論文審査結果の要旨

アトピー性皮膚炎は、掻痒のある湿疹を主病変とする慢性炎症性疾患であり、アレルギー炎症の側面と角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリアー機能障害を特徴とする。病態の慢性化には、掻破—皮膚炎悪化—掻痒悪化の悪循環は itch-scratch-cycle が大きな役割を果たしている。最近、掻痒誘発因子の一つとして IL-31 が注目されてきているが、そのアトピー性皮膚炎病態形成への寄与はいまだ不明である。本研究では 1) IL-31 による誘発される掻痒の特徴の解析 2) IL-31 の皮膚ケラチノサイトに対する作用 3) 皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果を検討し、IL-31 の作用を遮断することが、アトピー性皮膚炎の新たな治療標的となるかを明らかにすることを目的として施行された。

IL-31 投与は、投与ルート(静脈内、皮下、皮内)に関係なく 4-6 時間をピークとする掻痒を誘発した。その掻痒は、抗ヒスタミン薬、免疫用製薬、 μ -opioid receptor antagonist によって抑制されず、新規のメカニズムが介在する掻痒であることが明らかになった。IL-31 は、皮膚に対する慢性炎症惹起に関与し、表皮ケラチノサイトのアポトーシスを誘導し、バリアー機能低下に関与することが明らかとなった。さらに、アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いた検討では、IL-31 レセプター中和抗体が皮膚炎に対する予防効果および治療効果を発揮することを示した。

本研究は、アトピー性皮膚炎の新たな治療手段として、抗 IL-31 レセプター中和抗体が有用であることを示すものであり、掻痒および慢性炎症の画面からの効果を明らかにした新規の知見である。難渋するアトピー性皮膚炎の治療におけるインパクトは高く、今後さらなる発展性が期待できる。本研究を発信する意義は大きく、本論文は学位論文(博士、薬科学)に値するものと考えた。さらに、審査にて、申請者は、博士(薬科学)の学位にふさわしい見識を有していると評価した。